

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Problem Image Mailbox.**

⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑪ DE 37 15662 A 1

⑥ Int. Cl. 4:  
**A61K 37/02**  
A 61 K 37/50  
A 61 K 37/47

②① Aktenzeichen: P 37 15 662.4  
②② Anmeldetag: 11. 5. 87  
②③ Offenlegungstag: 19. 11. 87

Behördenelgentum

DE 37 15662 A 1

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③④  
12.05.86 US 862046 12.05.86 US 862057  
07.07.86 US 862046 07.07.86 US 862057

⑦① Anmelder:  
The Wellcome Foundation Ltd., London, GB

⑦④ Vertreter:  
Eitle, W., Dipl.-Ing.; Hoffmann, K., Dipl.-Ing.  
Dr.rer.nat.; Lehn, W., Dipl.-Ing.; Fücksle, K.,  
Dipl.-Ing.; Hansen, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Brauns, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Görg, K.,  
Dipl.-Ing.; Kohlmann, K., Dipl.-Ing.; Kolb, H.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Ritter und Edler von  
Fischern, B., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.; Nette, A.,  
Rechtsanw., 8000 München

⑦② Erfinder:  
Berger jun., Henry, Cary, N.C., US; Frangakis, Crist  
John, Durham, N.C., US

⑥④ Neue pharmazeutische Anwendung

Verwendung von t-PA, gewünschtenfalls in Kombination  
mit SOD, zur Inhibierung des Schadens gegenüber gefähr-  
detem Gewebe während einer Blut-Reperfusion.

DE 37 15662 A 1

1. Verwendung von t-PA zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren von Schäden bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion bei einem Säuger.
2. Verwendung von t-PA und SOD zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren von Schäden bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion bei einem Säuger.
3. Verwendung von t-PA und SOD zur Herstellung eines Arzneimittels zur Entfernung eines Blutgerinnsels und zum Inhibieren des Schadens bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion bei einem Säuger.
4. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gewebe Myocardialgewebe ist.
5. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die t-PA in der einkettigen Form vorliegt.
6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die t-PA in der zweikettigen Form vorliegt.
7. Verwendung gemäß Anspruch 5 oder 6, worin die t-PA die in Fig. 1 angegebene Aminosäuresequenz aufweist oder die gleiche Aminosäuresequenz aufweist, wobei jedoch die Aminosäure in der 245. Stellung von der Serin-N-Endgruppe Valin anstelle von Methionin ist, wobei jede dieser Sequenzen gewünschtenfalls eine zusätzliche Polypeptid-N-Endgruppen-Präsequenz von Gly-Ala-Arg hat.
8. Verwendung gemäß Anspruch 2 oder 3, wobei die SOD die Kupfer/Zink-Form von Rinder- oder humanem Ursprung ist.
9. Eine Kombination von t-PA und SOD.
10. Eine Kombination von t-PA und SOD zur Verwendung bei der Human- und Veterinärmedizin.
11. Eine Kombination von t-PA und SOD für die Verwendung der Inhibierung von Schäden bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion bei einem Säuger.
12. Eine Kombination von t-PA und SOD für die Verwendung zur Entfernung eines Blutgerinnsels und Inhibierung von Schäden bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion bei einem Säuger.
13. Eine Kombination gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, worin die t-PA in der einkettigen Form vorliegt.
14. Eine Kombination gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, worin die t-PA in der zweikettigen Form vorliegt.
15. Eine Kombination gemäß Anspruch 13 und 14, worin die t-PA die in Fig. 1 angegebene Aminosäuresequenz aufweist oder die gleiche Aminosäuresequenz, wobei jedoch die Aminosäure in der 245. Stellung von der Serin-N-Endgruppe Valin anstelle von Methionin ist und wobei jede der Sequenzen gewünschtenfalls eine zusätzliche Polypeptid-N-Endgruppen-Präsequenz von Gly-Ala-Arg hat.
16. Eine Kombination gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, worin die SOD die Kupfer/Zink-Form von Rinder- oder humanem Ursprung ist.
17. Pharmazeutische Formulierung, umfassend eine Kombination gemäß einem der Ansprüche 9 bis 16 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

Die Erfindung betrifft einen neuen Gewebeplasminogen-Aktivator, dessen Kombination mit Superoxiddismutase, pharmazeutische Formulierungen davon und die Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin.

Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Enzym, das in der Lage ist, Blutgerinnsel zu bilden, dem Koagulationssystem und dem Enzym, das in der Lage ist, Blutgerinnsel aufzulösen, dem fibrinolytischen System, welches ein intaktes Patentvaskularbett aufrecht erhält. Um den Blutverlust bei Verletzungen zu inhibieren, werden Blutgerinnsel in den verletzten Gefäßen gebildet. Nach einer natürlichen Reparatur der Verletzung, werden die überflüssigen Blutgerinnsel durch die Wirkung des fibrinolytischen Systems aufgelöst. Gelegentlich bilden sich Blutgerinnsel ohne traumatische Verletzungen und können in den Hauptblutgefäßen eine teilweise oder sogar völlige Unterbindung des Blutflusses bewirken. Wenn dies im Herzen, in der Lunge oder im Gehirn stattfindet, dann ist das Ergebnis ein Herzinfarkt, eine Lungenembolie oder ein Schlaganfall. Diese Zustände in Kombination sind die hauptsächlichsten Ursachen für die Sterbeanfälligkeit und Mortalität in den Industrienationen.

Blutgerinnsel bestehen aus faserigem Netzwerk, welches durch das proteolytische Enzym Plasmin wieder aufgelöst werden kann. Dieses Enzym leitet sich von dem inaktiven Proenzym Plasminogen, einer Komponente des Blutplasmas durch die Wirkung eines Plasminogenaktivators ab. Es gibt zwei immunologisch unterschiedliche Plasminogenaktivatoren bei Säugern. Der Intrinsik-Plasminogenaktivator, der auch als Urokinase bekannt ist, ist ein von den Nieren produziertes Enzym und kann aus Urin gewonnen werden. Er kann auch in einer Anzahl von Gewebekulturquellen hergestellt werden. Der Extrinsik-Plasminogenaktivator, der auch als vaskularer Plasminogenaktivator bekannt ist und als Gewebeplasminogenaktivator (t-PA), kann aus zahlreichen Gewebekomponenten (vor allen Dingen humanem Uterus), den vaskulären Zellwänden und aus einigen Zellkulturen isoliert werden. Zusätzlich zu diesen beiden Arten von Plasminogenaktivatoren gibt es auch ein bakterielles Produkt, Streptokinase, das aus  $\beta$ -hämolytischen Streptococci hergestellt wird. Ein Hauptnachteil bei sowohl Urokinase und Streptokinase besteht darin, dass diese im gesamten Kreislauf aktiv sind und nicht nur an den Stellen eines Blutgerinnsels. Sie können beispielsweise andere Blutproteine, wie Fibrinogen, Prothrombin, Faktor V und Faktor VIII, zerstören und so die Blutgerinnungsfähigkeit vermindern und das Risiko einer Blutung erhöhen. Im Gegensatz hierzu hängt die biologische Aktivität von t-PA von dem Vorhandensein von Fibrin, an welches es sich bindet und wo es aktiviert wird, ab. Die maximale Aktivität wird deshalb nur an den Stellen eines Blutgerinnsels entwickelt, d. h. in Gegenwart von Fibrin wird das Netzwerk aufgelöst und dadurch wird in erheblichem Masse das Risiko einer Blutung vermieden.

Die Unterbrechung des Blutstroms in einem Gefäß führt im allgemeinen zum Beginn einer Ischämie. Bei diesem Zustand wird dem Gewebe Sauerstoff vorenthalten und wird dadurch gefährdet und dies ergibt einen Zustand, bei dem das Gewebe verletzt, aber noch im wesentlichen lebensfähig ist. Wenn dieser Zustand aber während eines Zeitraums von beispielsweise 3 oder mehr Stunden beibehalten wird, dann wird das Gewebe nekrotisch und dieser Zustand kann, wenn er einmal

eingetreten ist, nicht wieder behoben werden. Es ist deshalb wichtig, dass eine Reperfusion, d. h. eine Wiederherstellung des Blutstroms, so schnell wie möglich stattfindet, um das Gewebe zu retten, bevor es permanent geschädigt wird. Ironischerweise ergibt die Reperfusion selbst, selbst wenn man sie durchführt, bevor das Gewebe nekrotisch wird, einen Komplex von Phänomenen, einschliesslich der putativen Bildung eines Superoxidradikals, welches einen verheerenden Einfluss auf hypoxisches Gewebe hat. Infolgedessen kann eine Reperfusion immer nur partiell zu einer Wiederherstellung des gefährdeten Gewebes führen, wobei der Rest permanent durch das Auftreten von einem oder mehreren dieser Phänomene geschädigt bleibt.

Es wurde nun gefunden, dass t-PA den Schaden bei gefährdetem Gewebe während einer Reperfusion inhibiert, indem es gegen eines oder mehrere der vorerwähnten Phänomene schützt. Der Mechanismus der Wirkung von t-PA und der Erzielung dieses Schutzes ist bisher noch nicht aufgeklärt worden, ist jedoch unabhängig von seiner Wirkung als thrombolytisches Mittel. Diese neuentdeckte Eigenschaft ermöglicht somit, dass t-PA oder eine pharmazeutische Formulierung davon als ein Inhibitor gegenüber dem Schaden von gefährdetem Gewebe unter den vorgenannten Umständen verwendet wird. Die Erfindung betrifft somit

- (a) ein Verfahren zum Inhibieren des Schadens bei gefährdetem Gewebe während der Reperfusion bei einem Säuger und besteht darin, dass man dem Säuger eine wirksame Menge von t-PA verabreicht;
- (b) die Verwendung von t-PA zum Inhibieren des Schadens von gefährdetem Gewebe während der Reperfusion bei einem Säuger;
- (c) die Verwendung von t-PA zur Herstellung eines Arzneimittels zum Inhibieren des Schadens bei gefährdetem Gewebe während der Reperfusion bei einem Säuger; oder
- (d) eine pharmazeutische Formulierung zur Verwendung, um Schäden bei gefährdetem Gewebe während der Reperfusion bei einem Säuger zu inhibieren, wobei diese Formulierung t-PA und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

Obwohl die vorliegende Erfindung angewendet werden kann, um jegliches gefährdete Gewebe zu schützen, ist es ganz besonders geeignet, um Schäden bei gefährdetem Myocardgewebe zu inhibieren.

Das bei der vorliegenden Erfindung zu verwendende t-PA kann irgendein bioaktives Protein, das im wesentlichen dem Säugetier- und insbesondere Human-t-PA entspricht, sein und schliesst Formen mit und ohne Glycosilation ein. Es kann ein- oder zweikettiges t-PA sein oder eine Mischung davon, wie dies in EP-A-1 12 122 beschrieben wird, und im Falle von vollständig glycosiliertem Human-t-PA hat es ein scheinbares Molekulargewicht auf Polyacrylamidgel von etwa 70.000 und einen isoelektrischen Punkt zwischen 7,5 und 8,0. Vorzugsweise hat das t-PA eine spezifische Aktivität von etwa 500.000 IU/mg (Internationale Einheit/mg, wobei eine Internationale Einheit die von der WHO, National Institute of Biological Standards and Control, Holly Hill, Hampstead, London, NW3 6RB, U. K., definierte Aktivitätseinheit ist).

Aminosäuresequenz von t-PA entspricht vorzugsweise im wesentlichen der in Fig. 1 gezeigten. Diese Sequenz ist somit identisch mit der von Fig. 1 oder enthält

eine oder mehrere Aminosäureweglassungen, Substitutionen, Einschreibungen, Inversionen oder Zugaben allelischen Ursprungs, wobei ansonsten die erhaltene Sequenz zu wenigstens 80% und vorzugsweise 90% homolg mit der in Fig. 1 gezeigten Sequenz ist und im wesentlichen die gleichen biologischen und immunologischen Eigenschaften des Proteins beibehält. Insbesondere ist die Sequenz identisch mit der von Fig. 1 oder hat die gleiche Sequenz, wobei jedoch die Aminosäure in der 245. Stellung von der Serin-N-Endgruppe Valin anstelle von Methionin ist und wobei jede dieser Sequenzen gewünschtenfalls eine zusätzliche Polypeptid-N-Endgruppen-Präsequenz von Gly-Ala-Arg aufweist.

Die in Fig. 1 gezeigte Aminosäuresequenz hat fünf- unddreissig Cysteinreste und ist somit in der Lage, sieben Disulfidbrücken auszubilden. Basierend auf einer Analogie mit anderen Proteinen, deren Struktur in grösserem Detail bestimmt wurde, wird die postulierte Struktur für die Sequenz (die sich aus der Disulfid-Brückenbildung ergibt) zwischen der Aminosäure in der 90. Stellung und der Prolin-C-Endgruppe in Fig. 2 gezeigt. Die Struktur der N-Endgruppenregion ist weniger sicher, obwohl hier einige Vorschläge gemacht worden sind (Progress in Fibrinolysis, 1983, 6, 269—273; und Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81, 5355—5359). Das wichtigste Merkmal der Struktur der t-PA sind die beiden "Kringel"-Regionen (zwischen der 92. und 173. Aminosäure und zwischen der 180. und 261. Aminosäure), die für die Bindung des Proteins an Fibrin verantwortlich sind, und die Serinprotease-Region, welche den Hauptteil der B-Kette ausmacht und die für die Aktivierung von Plasminogen verantwortlich ist. Die Aminosäure von besonderer Bedeutung bei Serinprotease, ist die katalytische Triade, His/Asp/Ser. In t-PA erscheinen diese in den Stellungen 322, 371 und 463. Die Disulfid-Brücken zwischen den 264. und 395. Cysteinaminosäureresten ist ebenfalls wichtig, weil sie die A- und die B-Ketten in der zweikettigen Form von t-PA zusammenhält.

In Fig. 1 und 2 wurden die üblichen, drei Buchstaben enthaltenden Codierungen für die Aminosäurereste in folgender Weise angewendet:

Asp D Asparaginsäure  
Thr T Threonin  
Ser S Serin  
Glu E Glutaminsäure  
Pro P Prolin  
Gly G Glycin  
Ala A Alanin  
Cys C Cystein  
Val V Valin  
Ile I Isoleucin  
Leu L Leucin  
Tyr Y Tyrosin  
Phe F Phenylalanin  
His H Histidin  
Arg R Arginin  
Lys K Lysin  
Trp W Tryptophan  
Gln Q Glutamin  
Met M Methionin  
Asn N Asparagin

Die t-PA kann nach irgendeinem Verfahren, das aus dem Stand der Technik bekannt ist, hergestellt werden. Beispielsweise kann man sie aus normalen oder neoplastischen Zelllinien der in Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140—153, EP-A-1 766 oder EP-A-1 13 319 beschriebenen Art gewinnen. Vorzugsweise wird die t-PA jedoch aus kultivierten, transformierten und trans-

fektierten Zelllinien unter Verwendung der Rekombinant-DNA-Technologie, wie es beispielsweise in EP-A 93 619, EP-A-1 17 059, EP-A-1 17 060, EP-A-1 73 552, EP-A-1 74 835, EP-A-1 78 105, WO 86/01 538, WO 86/05 514 oder WO 86/05 807 beschrieben wird, erhalten. Es wird besonders bevorzugt, dass Ovarien von Chinesischen Hamsterzellen (CHO) zur Herstellung von t-PA verwendet werden und dass man sie in der in Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(7), 1750–1759, beschriebenen Weise gewinnt. Auf diese Weise wird der geklonte Gen kotransfiziert mit dem Gen, welches Dihydrofolatreduktase (dhfr) in dhfr-CHO-Zellen codiert. Transformantien entsprechend dhfr werden von einem Medium ohne Nucleoside ausgewählt und werden ansteigenden Konzentrationen von Methotrexat ausgesetzt. Die dhfr- und t-PA-Gene werden auf diese Weise koverstärkt und führen zu stabilen Zelllinien, die in der Lage sind, hohe Niveaus an t-PA auszudrücken.

Die t-PA wird vorzugsweise nach einem der aus dem Stand der Technik bekannten Methoden gereinigt, z. B. nach der Methode, wie sie beschrieben wird in Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140–153; J. Biol. Chem., 1979, 254(6), 1998–2003; ibid, 1981, 256(13), 7035–7041; Eur. J. Biochem., 1983, 132, 681–686; EP-A-41 766; EP-A-1 13 319 oder GB-A-21 22 219.

t-PA kann bei der vorliegenden Erfindung entweder allein oder in Kombination mit einem anderen therapeutischen Mittel, welches auch Schäden gegenüber gefährdetem Gewebe während der Reperfusion inhibiert, verwendet werden. Ein besonders geeignetes Beispiel für eine solche Kombination ist die Kombination mit Superoxiddismutase (SOD), einem Enzym, das bekanntlich Superoxidradikale, also eines der Phänomene, welches Gewebeschäden verursacht, einfängt und zerstört. Tatsächlich wurde festgestellt, dass die Kombination von t-PA und SOD ein merklich stärkeres Inhibierungsniveau im Vergleich zu der Verwendung von t-PA oder SOD per se ergibt. Infolgedessen stellt die vorliegende Erfindung auch eine Kombination von t-PA und SOD zur Verfügung.

Die Kombination von t-PA und SOD ergibt ein besonders vorteilhaftes Mittel sowohl für die Entfernung von Blutgerinnseln und zum Inhibieren von Schäden bei gefährdetem Gewebe während einer nachfolgenden Reperfusion. Somit ergibt die Verabreichung von t-PA und SOD erstmalig die Entfernung von Blutgerinnseln durch die bekannte thrombolytische Wirkung von t-PA und dann die Inhibierung von Gewebeschäden durch die kombinierte Wirkung von t-PA und SOD.

Das in Kombination mit t-PA verwendete SOD kann irgendein bioaktives Protein sein, das im wesentlichen einer oder mehreren Gruppen der allgemein unter diesen Namen bekannten Enzyme entspricht. Es stammt vorzugsweise von einem Säuger und insbesondere von einem Rind oder Menschen und kommt im allgemeinen mit einem Metallkation, mit dem es normalerweise klassifiziert wird, vor. Beispiele für diese Metallkationen sind Eisen, Mangan, Kupfer und vorzugsweise Kombinationen von Kupfer mit anderen Metallen, wie Zink, Cadmium, Kobalt oder Quecksilber, wobei die Kupfer/Zink-Kombination besonders bevorzugt wird. Sowohl die Mangan- und die Kupfer/Zink-Formen von SOD kommen natürlich beim Menschen vor. Die Eisen- und Mangan-Formen von SOD sind ideale bakteriellen Ursprungs und haben ein Molekulargewicht von etwa 40.000 und sind Dimere. Die Mangan-Form von SOD ist eukaryotischen Ursprungs und hat andererseits ein Molekulargewicht von etwa 80.000 und ist ein Tetrameres.

Die Kupfer/Zink-Form von SOD ist eukaryotischen Ursprungs und hat ein Molekulargewicht von etwa 32.000 und ist ein Dimeres mit einem Kupferkation und einem Zinkkation pro Untereinheit. Das Kupferkation ist an vier Histidinreste pro Untereinheit als Ligand gebunden und das Zinkkation ist zwischen Histidin und Asparaginsäure als Ligand gebunden. Es gibt auch eine Kupfer/Zink-Form von SOD-eukaryotischen Ursprungs mit einem Molekulargewicht von etwa 130.000, welches aus vier Untereinheiten besteht. Die Molekulargewichte der verschiedenen Formen von SOD wurden bestimmt unter Verwendung von Sedimentationsgleichgewicht, Molekularsieben und unter Verwendung von Polyacrylamidgelen. Die isoelektrischen Punkte der verschiedenen Formen von SOD liegen im Bereich von 4 bis 6,5 in Abhängigkeit von dem Grad der Sulfation und/oder Desamidierung. Vorzugsweise beträgt die spezifische Aktivität der Kupfer/Zink-Form von SOD von Rindern oder menschlichen Ursprungs wenigstens 3.000 U/mg (die Aktivitätseinheit, die in J. Biol. Chem., 1969, 244, 6049–6055 definiert wird).

Die Aminosäuresequenz der Kupfer/Zink-Form von SOD von Rindern oder menschlichen Ursprungs entspricht vorzugsweise im wesentlichen der in J. Biol. Chem., 1974, 249(22), 7326 bis 7338, beschriebenen, im Falle, dass sie vom Rind stammt und der in Biochemistry, 1980, 19, 2310 bis 2316 und FEBS Letters, 1980, 120, 53 bis 55 beschriebenen, im Falle, dass sie vom Menschen stammt. Die Sequenz ist somit identisch mit der in diesen Artikeln beschriebenen oder enthält eine oder mehrere Aminosäureweglassungen, Substitutionen, Einschreibungen, Inversionen oder Additionen allelytischen Ursprungs, wobei die sich ergebende Sequenz aber ansonsten ausreichend homolog mit der veröffentlichten Sequenz ist und im wesentlichen die gleichen biologischen und immunologischen Eigenschaften aufweist.

Die Aminosäuresequenz der Kupfer/Zink-Form von SOD, die vom Rind abstammt, enthält drei Cysteinreste pro Untereinheit (J. Biol. Chem., 1974, 249(22), 7326–7338). Die intrakettige Disulfid-Brücke tritt zwischen Cys 55- und Cys 144-Resten auf, während die interkettige Disulfid-Brücke zwischen den Cys 6-Resten auftritt.

Die Aminosäuresequenz der Kupfer/Zink-Form von SOD menschlichen Ursprungs enthält vier Cysteinreste pro Untereinheit (Biochemistry, 1980, 19, 2310–2316 und FEBS Letters, 1980, 120, 53–55). Die intrakettige Disulfid-Brücke tritt zwischen Cys 57- und Cys 146-Resten auf, während die interkettige Disulfid-Brücke ebenfalls zwischen den Cys 6-Resten auftritt. Der Cys 111-Rest bleibt frei.

Das SOD kann auf irgendeine beschriebene oder aus dem Stand der Technik bekannte Weise erhalten werden. Beispielsweise kann man es von Erythrocyten oder aus Leber durch ein Extraktionsverfahren der in GB-A-14 07 807 und GB-A-15 29 890 beschriebenen Art gewinnen. Alternativ kann man SOD aus einer kultivierten, transformierten oder transfektierten Zelllinie, die sich von einer rekombinanten DNA-Technologie ableitet, und wie sie beispielsweise in der australischen Patentanmeldung 27 461/84, WO 85/01 503, EP-A-1 38 111, EP-A-1 64 566, EP-A-1 73 280 und EP-A-1 80 964 beschrieben wird, gewonnen werden.

Die SOD wird vorzugsweise nach beschriebenen oder aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt, z. B. nach dem in EP-A-1 12 299 beschriebenen Verfahren.

Bei der Verwendung von t-PA oder einer Kombina-

tion von t-PA und SOD werden der der die aktive(n) Bestandteil(e) vorzugsweise in Form einer pharmazeutischen Zubereitung angewendet. Im Falle der Kombination kann man die aktiven Bestandteile in getrennten Formulierungen anwenden, die dann gleichzeitig oder hintereinander verabreicht werden. Werden sie hintereinander verabreicht, dann wird es bevorzugt, dass man zuerst die t-PA-Formulierung und dann die SOD-Formulierung verabreicht. Auf jeden Fall sollte die Verzögerung bei der Verabreichung der zweiten der beiden Formulierungen nicht derartig sein, dass man den Vorteil der potenzierten Wirkung der Kombination der aktiven Bestandteile in vivo zum Inhibieren von Gewebeschäden verliert. Jedoch kann man anstelle von getrennten Formulierungen viel einfacher beide aktiven Bestandteile zusammen in einer einzigen kombinierten Formulierung anwenden. Infolgedessen stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung zur Verfügung, die t-PA und SOD und pharmazeutisch annehmbare Träger umfasst. Im Allgemeinen wird die t-PA oder die Kombination von t-PA und SOD auf intravaskularem Wege entweder durch Infusion oder durch Bolusinjektion verabreicht und infolgedessen ist eine parenterale Formulierung erforderlich. Vorzugsweise stellt man dem Arzt oder dem Veterinär eine lyophilisierte Formulierung zur Verfügung, weil diese Vorteile beim Transport und beim Lagern ergibt. Der Arzt oder der Veterinär kann dann die lyophilisierte Formulierung in geeigneter Weise mittels eines Lösungsmittels zum erforderlichen Zeitpunkt rekonstituieren.

Parenterale und lyophilisierte pharmazeutische Zusammensetzungen, enthaltend t-PA, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Beispiele hierfür sind EP-A-41 766; EP-A-93 619; EP-A-1 12 122; EP-A-1 13 319; EP-A-1 23 304; EP-A-1 43 081; EP-A-1 56 169; WO 86/01 104; japanische Patentveröffentlichung 57-1 20 523 (Anmeldung 56-6 936) und japanische Patentveröffentlichung 58-65 218 (Anmeldung 56-1 63 145). Weitere bevorzugte Beispiele schliessen GB-A-21 76 702 und GB-A-21 76 703 ein. Alle diese Formulierungen sind für SOD und die Kombination von t-PA und SOD geeignet.

Intravaskuläre Infusionen werden normalerweise durchgeführt mit parenteraler Lösung, die in einem Infusionsbeutel oder einer -flasche oder innerhalb einer elektrisch betriebenen Infusionsspritze enthalten sind. Die Lösungen können aus dem Infusionsbeutel oder der Infusionsflasche dem Patienten durch Schwerkraftzufuhr oder mittels einer Infusionspumpe verabreicht werden. Die Anwendung des Schwerkraftzuführungs-Infusionssystems ermöglicht keine Kontrolle über die Verabreichungsrate der parenteralen Lösung und infolgedessen ist die Anwendung einer Infusionspumpe besonders für solche Lösungen, die verhältnismässig hohe Konzentrationen an aktiven Bestandteilen enthalten, bevorzugt. Noch bevorzugter ist jedoch die Verwendung einer elektrisch betriebenen Infusionsspritze, die eine noch grössere Kontrolle bei der Verabreichungsrate ermöglicht.

Eine wirksame Menge an t-PA und einer Kombination von t-PA und SOD zum Inhibieren des Schadens bei gefährdeten Geweben während der Reperfusion hängt selbstverständlich von einer Reihe von Faktoren ab, beispielsweise dem Alter und dem Gewicht des Säugers, dem genauen Zustand, der einer Behandlung bedarf und dessen Schwere, der Verabreichungsrouten, und unterliegt letztlich der Entscheidung des Arztes oder

des Veterinärs. Eine wirksame Dosis liegt jedoch im Falle von t-PA im allgemeinen im Bereich von 0,2 bis 4 mg/kg (d. h. 100.000 bis 2.000.000 IU/kg, in der Annahme, dass die spezifische Aktivität für t-PA 500.000 IU/mg beträgt) und vorzugsweise bei 0,3 bis 2 mg/kg (d. h. 150.000 bis 1.000.000 IU/kg) Körpergewicht des Patienten pro Stunde. Dies heisst, dass bei einem 70 kg schweren Erwachsenen eine wirksame Menge pro Stunde vorzugsweise bei 20 bis 140 mg (d. h. 10.000.000 bis 70.000.000 IU) und insbesondere 70 mg (d. h. 35.000.000 IU) liegt. Wird SOD in Kombination mit t-PA angewendet, dann beträgt eine wirksame Dosis an SOD im allgemeinen 1.000 bis 50.000 U/kg und vorzugsweise 7.000 bis 20.000 U/kg Körpergewicht des Patienten pro Stunde. Für einen 70 kg schweren Erwachsenen beträgt eine wirksame Menge an SOD vorzugsweise 500.000 bis 1.500.000 U.

Die nachstehenden Beispiele beschreiben die vorliegende Erfindung, ohne diese in irgendeiner Weise zu beschränken.

#### Beispiel 1 — Herstellung einer parenteralen Formulierung von t-PA

Eine parenterale Formulierung von t-PA wird im wesentlichen gemäss GB-A-21 76 703 hergestellt. Die t-PA hat eine spezifische Aktivität von etwa 300.000 IU/mg.

#### Beispiel 2 — Herstellung einer parenteralen Formulierung von SOD

Rinder-SOD in der Kupfer/Zink-Form wurde von Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA, 63178, in Form eines Pulvers erhalten und in Form einer im wesentlichen neutralen physiologischen Kochsalzlösung gelöst.

#### Beispiel 3 — Herstellung einer parenteralen Formulierung von t-PA und SOD

Die Formulierung der Beispiele 1 und 2 wurde miteinander vermischt und in physiologischer Kochsalzlösung unter Erhalt der gewünschten Dosis weiterverdünnt.

#### Beispiel 4 — Schutz von gefährdetem Gewebe mittels t-PA und t-PA und SOD

##### (a) Methode:

Männliche Beagle-Hunde (10 bis 12 kg) wurden mit Pentobarbitalnatrium anästhetisiert, intubiert und mit Raumluft mittels eines Harvard-Respirators ventiliert. Infusionskatheter und arterielle Blutdruck-Messinstrumente wurden in die linke Jugularvene und die linke Carotidarterie eingepflanzt. Eine Thoracotomie wurde an dem vierten Intercostalraum durchgeführt, das Herz wurde in einer perikardialen Wiege suspendiert und die linke anteriore absteigende Arterie (LAD) genau unterhalb des ersten Hauptdiagonalzweiges isoliert. Eine elektromagnetische Fliesssonde wurde in die LAD eingefügt. Eine 90-minütige Unterbrechung der LAD wurde verursacht, indem man einen 1/0 Silberfaden distal zu der Fliesssonde zu einer Schlinge ausbildete. Die Behandlung wurde intravenös 15 Minuten vor der Freigabe dieser Schlinge klusion initiiert und 45 Minuten nach der Freigabe fortgesetzt. Die Thoracotomie wurde geschlossen und die Tiere liess man sich von dem chirurgischen Eingriff erholen. Die Tiere wurden 24 Stunden

nach der Okklusion reanästhetisiert und der Fluss in der LAD wurde nochmals gemessen. Dann wurde das Herz für eine P stromtempquantifizierung der Infarktgrösse entfernt.

Vier Gruppen von Hunden wurden untersucht. Gruppe 1 bestand aus einer Kontrolle, bei der gesättigte Kochsalzlösung verwendet wurde. Gruppe 2 erhielt 2,5 mg/kg (750.000 IU/kg) t-PA, Gruppe 3 erhielt 16.500 U/kg Rinder-SOD und Gruppe 4 erhielt sowohl 2,5 mg/kg (750.000 IU/kg) t-PA und 16.500 U/kg Rinder-SOD. Die verwendeten Formulierungen waren die der Beispiele 1 bis 3.

Die myokardialen Infarktstellen wurden durch eine ex vivoduale Reperfusionstechnik quantifiziert. In die LAD wurden unmittelbar distal zu der Einschnürungsstelle und in die Aorta oberhalb der Koronarostia Kanülen eingesetzt. Das LAD-Koronarbett wurde mit 1,5% Triphenyltetrazoliumhydrochlorid (TTC) in 0,02 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7,4) perfundiert. Die Aorta wurde retrograd mit 0,5% Evans Blue-Farbstoff perfundiert. Beide Regionen wurden mit den jeweiligen Färbemitteln bei einem konstanten Druck von 100 mmHg während 5 Minuten perfundiert. Das Herz wurde in 8 mm-Scheiben senkrecht zur Apex-Basenachse geschnitten. Die Fläche des linken Ventrikels, die einem Infarktrisiko unterlag aufgrund der anatomischen Abhängigkeit der LAD für den Blutfluss, wird durch den Mangel an Evans Blue in dieser Region identifiziert. Die Region des infarktierten Myocards innerhalb der Risikofläche wurde durch den Mangel an Färbung in dem Gewebe, wenn eine Perfusion mit TTC erfolgte, aufgrund des Verlustes an Dehydrogenaseenzym ersichtlich.

Die transversalen Ventrikularschnitte wurden sorgfältig auf klare Acrylträger überführt, um einen permanenten Rekord der Infarktmorphologie zu erhalten und eine planimetrische Bestätigung der Infarktgrösse zu ermöglichen. Ventrikularschnitte wurden dann von dem rechten Ventrikularmuskel, Valvular und dem Fettgewebe vorgenommen. Die gesamte linke Ventrikelfläche, bei welcher das Infarktrisiko vorlag, wurde durch sorgfältiges Herausschneiden abgetrennt und gewogen. Die Infarktfläche wurde als Prozentsatz der anatomischen Fläche, die dem Risiko unterlag, ausgedrückt. Statistische Vergleiche der mit dem Arzneimittel behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe wurden unter Anwendung der Einweg-Varianzanalyse (Anova) unter Verwendung der Bonferroni'schen Methode für einen Mehrfachvergleich durchgeführt (Circulation Research, 1980, 47, 1-9). Ein  $p$ -Wert von weniger als 0,05 wurde als Kriterium für Signifikanz angesehen.

#### (b) Ergebnisse:

Tabelle

Gruppe	Anzahl der Hunde	Fläche des Infarktrisikos	% Ventrikel,* bei dem das Risiko vorlag
1 Kochsalzlösung	5	36,0 ± 8,9	37,3 ± 7,6
2 t-PA	6	14,3 ± 11,7	35,7 ± 5,4
3 SOD	4	13,0 ± 4,6	30,6 ± 2,6
4 t-PA + SOD	3	2,3 ± 1,3	37,2 ± 9,1

\* Daten wurden ausgedrückt als Mittel ± Standardirrtum

Das Verhältnis der linken ischämisch durch mechanische Abschnürung gemachten Ventrikel der LAD war nicht wesentlich verschieden zwischen irgendeiner der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe, gemessen durch Anova.

#### (c) Folgerungen:

Die Verwendung von t-PA inhibiert signifikant die Grösse des myokardialen Infarktes und dies zeigt dessen Fähigkeit, das während der Reperfusion gefährdete Gewebe zu schützen, an. Darüber hinaus ergibt die kombinierte Anwendung von t-PA und SOD eine synergistische Inhibierungswirkung in dieser Beziehung, wobei man durch die Kombination ein Inhibierungsniveau erzielt, das grösser ist als das einzeln von jeweils t-PA oder SOD selbst erzielt wird.

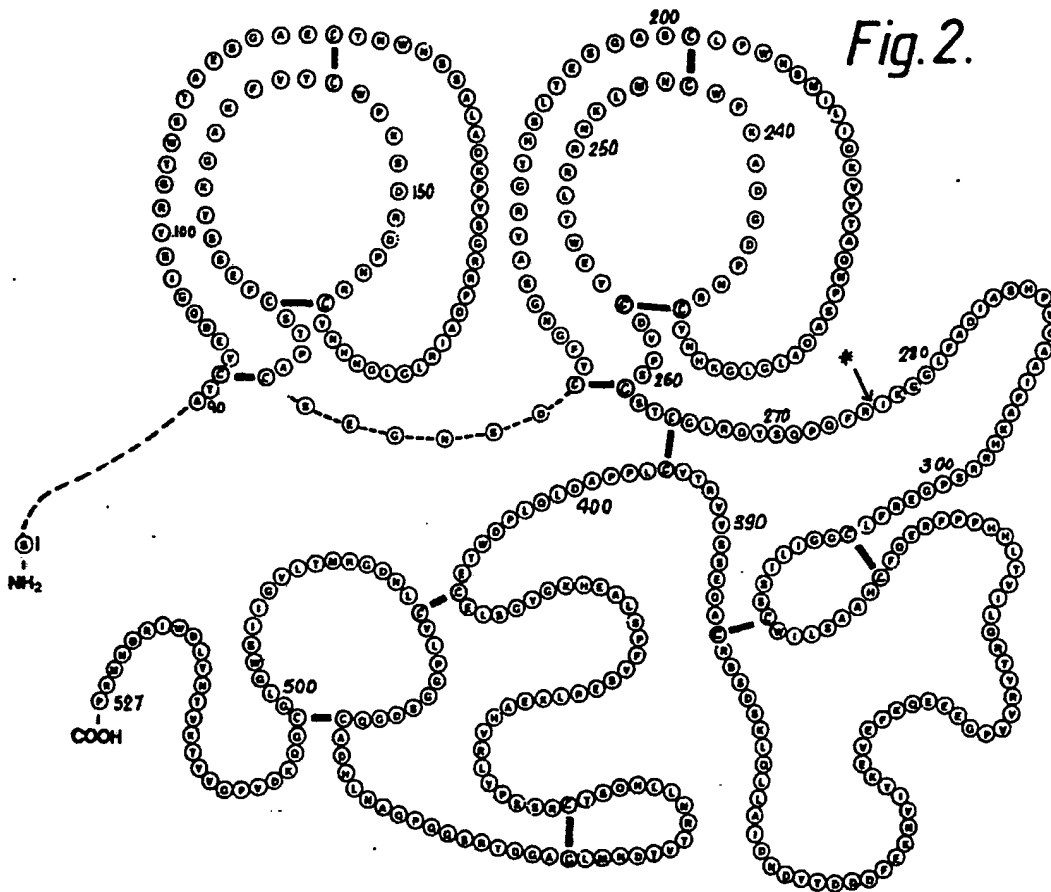
3715662

Nummer: 37 15 662  
 Int. Cl.4: A 61 K 37/02  
 Anmeldetag: 11. Mai 1987  
 Offenl gungstag: 19. November 1987

*Fig. 1.*

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser  
 1  
 Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly  
 Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn  
 50  
 Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu  
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln  
 Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp  
 100  
 Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg  
 Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp  
 150  
 Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys  
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His  
 Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys  
 200  
 Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr  
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg  
 250  
 Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr  
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp  
 Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly  
 300  
 Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe  
 Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu  
 Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr  
 350  
 Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln  
 Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp  
 400  
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr  
 Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser  
 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg  
 450  
 Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu  
 500  
 Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp  
 Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro





\*Spaltungsstelle bei einer einkettigen t-PA unter Erhalt einer zweikettigen t-PA, in welcher die A-Kette die beiden "Kringel"-Regionen und die B-Kette die Serinprotease-Region enthält.

ORIGINAL INSPECTED